

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平6-305955

(43) 公開日 平成6年(1994)11月1日

(51) Int.Cl. <sup>5</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
A 6 1 K 31/12	ADU	9283-4C		
	ADT	9283-4C		
	ADV	9283-4C		

審査請求 未請求 請求項の数 6 F D (全 9 頁)

(21) 出願番号	特願平5-122173	(71) 出願人	000000217 エーザイ株式会社 東京都文京区小石川4丁目6番10号
(22) 出願日	平成5年(1993)4月27日	(72) 発明者	酒井 達 埼玉県本庄市北掘 450-247
		(72) 発明者	田中 智英 埼玉県本庄市駅南2-8 エトワール本庄 704
		(72) 発明者	佐藤 加名 埼玉県児玉町八幡山 392-6
		(72) 発明者	日比 孝 埼玉県本庄市南 2-6-5 エーザイ青 雲寮

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 キノン系細胞分化誘導剤

(57) 【要約】

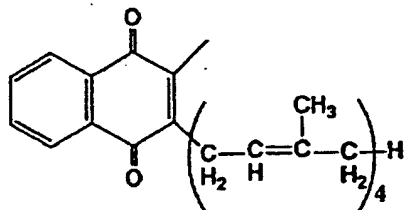
【目的】 従来、臨床的有用性の高い医薬品のなかった、細胞分化誘導作用に基づく造血器腫瘍・固形腫瘍などの疾患の治療・改善剤を提供する。

【構成】 従来の癌薬物治療法の基礎となる考え方は、増殖能が異常に高い腫瘍細胞をすべて死滅させるというものであるが、正常細胞に対しても毒性を示すため重篤な副作用が避けられず治療効果にも限界があった。しかし安全性が極めて高いビタミンK剤・止血剤等として利用されているメナテトレノン<sup>®</sup>は、意外にも細胞分化誘導作用を有しており、造血器腫瘍・固形腫瘍等の各種癌・悪性腫瘍に対する、臨床上有用な治療・改善剤となり得る。

2

には、正常血球細胞の減少は赤血球減少による貧血・顆粒球減少による感染症や発熱・血小板の減少による出血傾向として現れ、正常造血の抑制は骨髓不全を招く。癌が予後不良な疾患であることは一般によく知られるところであり、これまでも種々の薬剤や治療方法が検討されてきた。

10 【0004】それらの中でも薬物治療法の基礎となる考え方は、腫瘍細胞である白血病細胞をすべて死滅させることにより治療効果を得るというものであり、従ってよりよい治療成績を上げるために、増殖能が異常に高い腫瘍に対し、細胞毒性による殺細胞作用をより強力に示す薬剤の開発や、併用療法、高濃度・多量投与療法などが試みられてきた。しかしこれらの薬剤や治療法は、腫瘍細胞だけに特異的に作用するのではなく、正常細胞に対しても毒性を示すため、心臓・心筋障害、骨髄機能抑制、悪心・嘔吐、神経障害、脱毛等の重篤な副作用が発現し、治療効果にも限界があった。



10

20

【0005】一方、従来の制癌剤と比較して安全性のより高い各種分化誘導剤が、*in vitro*において腫瘍細胞を成熟細胞へ分化誘導する事実は知られており、分化誘導療法への期待が集まっていたが、残念ながら従来の分化誘導剤では臨床での有用性が認められていなかった。しかし1988年にヒュン(Huang)らが、オールトランスレチノイン酸(以下、ATRA)が急性前骨髄性白血病(以下、APL)患者に対し100%に近い完全寛解をもたらした臨床成績を報告して以来〔ブラッド(Blood), 72, 567-572, 1988.〕、世界各国においてその効果が再確認され、造血器腫瘍のみならず固形腫瘍を含めた広い範囲の癌に対する分化誘導療法に期待が高まりつつある。

37

【従来技術】前述のように、ATRAが臨床において APLに有効であることは、ヒュン(Huang)ら【ブラッド(Blood), 72, 567-572, 1988.】を始め、キャストン(Castaing)ら【ブラッド(Blood), 76, 1704-1709, 1990.】、ワレル(Warrell)ら【ニューイングランド・ジャーナル・オブ・メディスン(New Engl. J. Med.), 324, 1385-1393, 1991.】など、多く研究者が報告している。

【0007】またオルソン(Olsson)らは、ビタミンD<sub>3</sub>の生理活性型代謝物である 1 $\alpha$ , 25-ジヒドロキシコレカルシフェロール (以下、活性V<sub>D</sub><sub>3</sub>) が、ヒト・リンパ腫培養細胞系 (U937) において分化誘導作用を有することを報告している [キャンサー・リサーチ(Cancer Res.), 43(12Pt1), 5862-5867, 1983.]. これより分化誘導作用を有する活性V<sub>D</sub><sub>3</sub>誘導体の開発も盛んに行われるようになり、例えば特開昭61-33165号公報には24-アルキル-25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>誘導体が抗腫瘍作用を有することが、また特開昭 61-140560号公報には20-オキサ-21-ノル-25-ヒドロキシビタミンD<sub>3</sub>誘導体が分化誘導作用を有することが、それぞれ開示されている。

50 【0008】 ツァン(Zhang) らは、ブファリン(Bufali

22

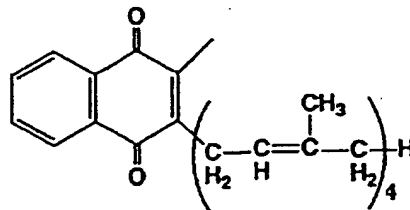
—518—

【発明の背景】わが国における死亡原因の第一位を癌が占めるようになって久しく、しかも患者数は年々増加してきており、有効性および安全性の高い薬剤や治療法の開発が、今や国民・研究者・行政の最大関心事となっている。

【0003】癌（腫瘍）は発現部位・病理像・症状等により多岐に分類されるが、造血器腫瘍の代表的疾患である白血病は血液細胞（白血球）の腫瘍であり、未分化の各種幼若型白血球細胞の増殖が特徴である。またそれらの中でも、増加している腫瘍細胞が未成熟な芽球であるものを急性白血病、成熟細胞であるものを慢性白血病と分類しており、多岐にわたる臨床症状を呈するが、その多くは、正常造血の抑制に基づく症状と、他臓器への浸潤・圧迫に基づく症状に大別することができる。具体的

【0014】さらにシトシン・アラビノシドやアクラシノマイシンAも安全性上の問題から国内では薬剤として許可されておらず、インターフェロン- $\alpha$ の抗腫瘍作用

【化2】



—519—

定されない。なおメナテトレノン<sup>5</sup>は、医薬品、化粧品、食品、工業原料などとして広く販売されており、容易に入手することができる。

【0021】従って本発明の目的は、分化誘導作用を有する臨床的有用性の高い、各種癌に対する治療・改善剤を提供することにある。具体的にはメナテトレノンを有効成分とする、造血器腫瘍・固形腫瘍等の各種癌・悪性腫瘍の治療・改善剤、および本化合物の分化誘導作用が有効な疾患の治療・改善剤に関する。ここで造血器腫瘍の具体的疾患名の一例としては、例えば急性白血病、慢性白血病、悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、マクログロブリン血症などを挙げることができ、また固形腫瘍としては、例えば脳腫瘍、頭頸部癌、乳癌、肺癌、食道癌、胃癌、大腸癌、肝癌、胆嚢・胆管癌、膀胱癌、膵島細胞癌、腎細胞癌、副腎皮質癌、膀胱癌、前立腺癌、睪丸腫瘍、卵巣癌、子宮癌、絨毛癌、甲状腺癌、悪性カルチノイド腫瘍、皮膚癌、悪性黒色腫、骨肉腫、軟部組織肉腫、神経芽細胞腫、ウィルムス腫瘍、胎児性横紋筋肉腫、網膜芽細胞腫などを挙げることができるが、本発明の対象疾患がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【0022】また本発明においては上記治療・改善剤としての有効性に加え、長期間投与しても極めて高い安全性が期待できることから、長期間治療を続けることが可能となり、癌患者のクオリティ・オブ・ライフの改善に大きく貢献する発明であると言える。

【0023】次にメナテトレノンの安全性を示すために、急性毒性試験試験結果(LD<sub>50</sub>値)を示す。

【表1】

メナテトレノンの急性毒性 (mg/kg)

動物種	性別	経口	皮下	腹腔内
マウス (ICR系)	♂	> 5,000	> 5,000	> 5,000
	♀	> 5,000	> 5,000	> 5,000
ラット (SD系)	♂	> 5,000	> 5,000	> 5,000
	♀	> 5,000	> 5,000	> 5,000

【0024】表1から、メナテトレノンの極めて高い安全性が明らかである。さらに前述のようにメナテトレノンはすでに医薬品として広く臨床で使用されており、その安全性は確認されている。

【0025】投与剤型としては、例えば散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤などの経口製剤、注射製剤および外用剤(経皮製剤)が挙げられる。製剤化の際には、通常の製剤担体を用いて常法により製造することができる。

【0026】すなわち経口製剤を製造するには、メナテトレノンと賦形剤、さらに必要に応じて結合剤、崩壊剤、滑沢剤、着色剤、矯味矯臭剤などを加えた後、常法により散剤、細粒剤、顆粒剤、錠剤、被覆錠剤、カプセル剤等とする。

【0027】賦形剤としては、例えば乳糖、コーンスタ

結晶セルロース、二酸化ケイ素などが、結合剤としては、例えばポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、メチルセルロース、エチルセルロース、アラビアゴム、トラガント、ゼラチン、シェラック、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ポリビニルピロリドン、ポリプロピレングリコール・ポリオキシエチレン・ブロックポリマー、メグルミンなどが、崩壊剤としては、例えば澱粉、寒天、ゼラチン末、結晶セルロース、炭酸カルシウム、炭酸水素ナトリウム、クエン酸カルシウム、デキストリン、ペクチン、カルボキシメチルセルロース・カルシウム等が、滑沢剤としては、例えばステアリン酸マグネシウム、タルク、ポリエチレングリコール、シリカ、硬化植物油等が、着色剤としては医薬品に添加することが許可されているものが、矯味矯臭剤としては、ココア末、ハッカ脂、芳香散、ハッカ油、竜腦、桂皮末等が用いられる。これらの錠剤・顆粒剤には糖衣、その他必要により適宜コーティングすることはもちろん差支えない。

【0028】また注射用製剤を製造する際には、メナテトレノンにpH調整剤、溶解剤、等張化剤などと、必要に応じて溶解補助剤、安定化剤などを加えて、常法により製剤化する。

【0029】外用剤を製造する方法は限定されず、常法により製造することができる。すなわち製剤化にあたり使用する基剤原料としては、医薬品、医薬部外品、化粧品等に通常使用される各種原料を用いることが可能である。

【0030】使用する基剤原料として具体的には、例えば動植物油、鉱物油、エステル油、ワックス類、高級アルコール類、脂肪酸類、シリコン油、界面活性剤、リン脂質類、アルコール類、多価アルコール類、水溶性高分子類、粘土鉱物類、精製水などの原料が挙げられ、さらに必要に応じ、pH調整剤、抗酸化剤、キレート剤、防腐防霉剤、着色料、香料などを添加することができるが、本発明にかかる外用剤の基剤原料はこれらに限定されない。また必要に応じて他の分化誘導作用を有する成分、血流促進剤、殺菌剤、消炎剤、細胞賦活剤、ビタミン類、アミノ酸、保湿剤、角質溶解剤等の成分を配合することもできる。なお上記基剤原料の添加量は、通常外用剤の製造にあたり設定される濃度になる量である。

【0031】本発明におけるメナテトレノンの臨床投与量は、症状、重症度、年齢、合併症などによって異なり限定されず、また化合物の種類・投与経路などによっても異なるが、通常成人1日あたり10mg~10gであり、好ましくは50mg~5gであり、さらに好ましくは100mg~1gであり、これを経口、静脈内または経皮投与する。

【0032】次に本発明を具体的に説明するため以下に実施例を掲げるが、本発明がこれらに限定されないことは言うまでもない。

【0033】

## 【実施例】

## 実施例1 顆粒剤

\* 【0034】

\* 【表2】

## &lt;処方&gt;

原料	配合量 (mg)
1) メナテトレノン	100.0
2) 無水ケイ酸	100.0
3) D-マンニトール	450.0
4) ヒドロキシプロピルセルロース	40.0
5) dl-α-トコフェロール	0.2
6) タルク	10.0
7) 乳糖	約 300.0

## 【0035】 実施例2 錠剤

※ 【表3】

## 【0036】

※

## &lt;処方&gt;

原料	配合量 (mg)
1) メナテトレノン	10.0
2) ヒドロキシプロピルセルロース	50.0
3) 乳糖	100.0
4) トウモロコシデンプン	20.0
5) 無水ケイ酸	3.0
6) ステアリン酸マグネシウム	0.2
7) マクロゴール6000	3.0
8) ポリビニルピロリドン	0.6
9) アラビアゴム末	3.0
10) 沈降炭酸カルシウム	4.0
11) 酸化チタン	10.0
12) タルク	15.0
13) 白糖	約 60.0

## 【0037】 実施例3 注射剤

★ 【表4】

## 【0038】

★

## &lt;処方&gt;

原料	配合量 (重量%)
1) メナテトレノン	1.0
2) ポリオキシエチレンソルビタンモノオレート	3.5
3) D-ソルビトール	5.0
4) リン酸二水素ナトリウム (NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	0.08
5) リン酸水素ナトリウム (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.07
6) 精製水	加えて100.0

## 【0039】 実施例4 外用剤

☆ 【表5】

## 【0040】

☆

## &lt;処方&gt;

原料	配合量 (重量%)
1) メナテトレノン	1.0
2) スクワラン	10.0
3) ミリスチン酸イソプロピル	7.0
4) ベヘニルアルコール	1.0
5) セトステアリルアルコール	5.5
6) ステアリン酸モノグリセリン	2.0
7) dl-α-トコフェロール	0.05
8) POE (20) モノステアリン酸ソルビタン	2.0
9) キサンタンガム	0.1
10) 1,3-ブチレングリコール	2.0
11) グリセリン	3.0
12) D-ソルビトール	5.0
13) パラベン	0.2
14) 精製水	加えて100.0

## 【0041】

有用性を示すため、マウスB16 メラノーマ細胞および各

【発明の効果】次に本発明化合物の分化誘導剤としての 50 種ヒト白血病培養細胞系に対する効果実験例を挙げる。

なお実験に用いたヒト白血病培養細胞系は以下の通りである。

- (1) HL60; ヒト前骨髄性白血病細胞
- (2) U937; ヒト単芽球様白血病細胞
- (3) ML1; ヒト骨髄芽球様白血病細胞
- (4) K562; ヒト骨髄赤芽球白血病細胞

#### 【0042】実験1 マウスB16メラノーマ細胞に対するメナテトレノンの分化誘導作用

(方法) マウス由来 B16メラノーマ細胞に対するメナテトレノンの分化誘導作用を、メラニン生成能を指標として評価した。すなわちB16メラノーマ細胞を継代培養後、 $2 \times 10^4$  セル/ml になるよう 10%FCS MEM\* に加え培養用シャーレ ( $\phi=10\text{cm}$ ) にて24時間培養した。培養後、各試料が毒性を示さなかった濃度 ( $1.0 \times 10^{-6}$  M) に調整した 10%FCS MEM で培地交換を行った後、同条件で5日間培養した。培養後、等張緩衝塩類溶液 [日本製薬製、商品\*

マウスB16メラノーマ細胞に対するメナテトレノンの分化誘導作用

試料	培養細胞タンパク量あたりの総メラニン量 (%)
メナテトレノン	85
コントロール	100

【0046】表6から明らかなように、 $1.0 \times 10^{-6}$  M のメナテトレノンにて5日間培養処理した B16メラノーマ細胞の蛋白量あたりの総メラニン量 (ユーメラニンおよびフェオメラニン) は、コントロール培養細胞に比べ約 15%低下した。この時の細胞内チロシナーゼ量は、メナテトレノン処理により明らかに減少したことが SDS電気泳動法により確認された。

【0047】上記の結果はメナテトレノンの固形腫瘍に対する有効性を示すものであり、メナテトレノンの造血器腫瘍の分化誘導のみに止まらない幅広い適応性を示唆するものである。

#### 【0048】実験2~5 各種ヒト白血病培養細胞系に対するメナテトレノンの分化誘導作用

(方法) 実験2~5にかかる分化誘導作用の評価は、文献に記載されている方法 [中谷ら、*キャンサー・リサーチ* (Cancer Res.), 48, 4201-4205, 1988.] に従って行い、下記分化誘導マーカーについて測定・評価した。

- (1) 正常細胞への分化誘導マーカーであるニトロブルーテトラゾリウム (以下、NBT) 還元能は、細胞を NBT試薬と37℃で40分間インキュベートし、還元されて生じたフォルマザンを顕微鏡で観察して評価した。
- (2) 死細胞の割合 (細胞の viability) は、トリパンブルー試薬で染色された細胞を死細胞とし、全体の細胞数に対する百分率を算出した。

#### 【0049】(結果)

#### 実験2 ヒト前骨髄性白血病細胞 HL60 に対する分化誘導作用

次にヒト骨髄芽球様白血病細胞 HL60 に対する、メナテトレノンの濃度と分化誘導作用の関係を図1に示す。

\*名; Dulbecco's PBS(-) ] で洗浄し、0.25% トリプシン / エチレンジアミンテトラ酢酸 (EDTA) 溶液を用いて細胞を集め、さらに上記等張緩衝塩類溶液で再び洗浄した後、遠心分離 (100G) して細胞を得た。 (10%FCS MEM\* ; 標準培地に 10%ウシ胎仔血清、ペニシリン、ストレプトマイシンおよび炭酸水素ナトリウムを添加した培地)

【0043】得られた細胞に1mM-フェニルメチルスルホニルフルオリド (PMSF) 1ml を添加したリン酸緩衝液を加えた後、及川らの方法 (エール・ジャーナル・オブ・バイオロジカル・メディシン [Yale J. Biol. Med.], 46, 500-507, 1973.) にしたがって総メラニン量を吸光度 ( $\lambda=400\text{nm}$ ) で測定し評価した。

【0044】表6に、マウス由来 B16メラノーマ細胞に対するメナテトレノンの分化誘導作用を示す。

#### 【0045】

【表6】

マウスB16メラノーマ細胞に対するメナテトレノンの分化誘導作用

試料	培養細胞タンパク量あたりの総メラニン量 (%)
メナテトレノン	85
コントロール	100

#### 【0050】

【図1】

【0051】図1から明らかなように、メナテトレノン濃度の増加と共に NBT還元能 (分化誘導能) は増加し、 $1.0 \times 10^{-6}$  M のメナテトレノン処理では約 57%の細胞に分化が認められた。一方細胞数はメナテトレノン濃度の増加と共に減少し、同じく  $1.0 \times 10^{-6}$  M のメナテトレノン処理でコントロールの約 48%に減少し、増殖阻害作用も認められた。死細胞数の増加は、 $1.0 \times 10^{-6}$  M までコントロールと比較してわずかであり、細胞毒性はほとんど認められなかった。従ってメナテトレノンは、細胞毒性に基づかずに特徴的にHL60細胞の分化を誘導することが明らかである。

#### 【0052】実験3 ヒト単芽球様白血病細胞 U937 に対する分化誘導作用

ヒト単芽球様白血病細胞 U937 に対する、メナテトレノン濃度と分化誘導作用の関係を図2に示す。

#### 【0053】

【図2】

【0054】図2から明らかなように、メナテトレノン濃度の増加と共に NBT還元能 (分化誘導能) は増加し、 $1.0 \times 10^{-6}$  M のメナテトレノン処理では約 84%の細胞に分化が認められた。一方細胞数はメナテトレノン濃度の増加と共に減少し、同じく  $1.0 \times 10^{-6}$  M のメナテトレノン処理でコントロールの約 61%となり、増殖阻害作用も認められた。死細胞数は、 $5.0 \times 10^{-6}$  M までコントロールと比較して差は認められず、細胞毒性は認められなかった。従ってメナテトレノンは、細胞毒性に基づかずに特徴的にU937細胞の分化を誘導することが明らかである。

る。

【0055】実験4 ヒト骨髓芽球様白血病細胞 ML1に対する分化誘導作用

ヒト骨髓芽球様白血病細胞 ML1に対する、メナテトレノン濃度と分化誘導作用の関係を図3に示す。

【0056】

【図3】

【0057】図3から明らかなように、メナテトレノン濃度の増加と共に NBT還元能（分化誘導能）は増加し、

$1.0 \times 10^{-6} \text{M}$  のメナテトレノン処理で約 84%の細胞に分化が認められた。一方細胞数はメナテトレノン濃度の増加と共に減少し、同じく  $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$  のメナテトレノン処理でコントロールの約 61%となり、増殖阻害作用も認められた。死細胞数は、 $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$  までコントロールと比較して差は認められず、細胞毒性は認められなかった。従ってメナテトレノンは、細胞毒性に基づかずに特徴的に ML1細胞の分化を誘導することが明らかである。

【0058】実験5 ヒト骨髓赤芽球白血病細胞 K562に対する分化誘導作用

ヒト骨髓赤芽球白血病細胞 K562 に対する、メナテトレノン濃度と分化誘導作用の関係を図4に示す。

【0059】

【図4】

【0060】図4から明らかなように、メナテトレノン濃度の増加と共に NBT還元能（分化誘導能）は明らかに増加し、 $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$  のメナテトレノン処理では 60%の細胞に分化が認められた。一方細胞数は  $1.0 \times 10^{-6} \text{M}$  以上の高濃度において減少し、細胞増殖抑制作用は弱かった。死細胞数は、 $2.0 \times 10^{-6} \text{M}$  までコントロールと比較して差は認められず、細胞毒性は認められなかった。この結果より、メナテトレノンは前記のように HL60、U937、ML1の各細胞に対するほど強くはないが、ヒト骨髓赤芽球白血病細胞 K562細胞の分化も誘導することが明らかである。

【0061】上記実験例の結果から、メナテトレノンは  $10^{-6} \sim 10^{-5} \text{M}$  濃度において、発生段階の異なる各種ヒト白血病細胞の分化を誘導することが明らかである。しかも取り分け骨髓芽球様白血病細胞 (HL60)、単芽球様白血病細胞 (U937)、骨髓芽球様白血病細胞 (ML1) に対する効果がより顕著であることが特徴的であり、骨髓赤芽球白血病細胞に対する分化誘導能も有している。

【0062】実験6 各種ヒト白血病培養細胞系における、メナテトレノンが他の分化誘導マーカーに与える効果

さらに NBT還元能と細胞数以外には、以下のマーカーが分化誘導の指標として利用されており、それぞれ次のような意味を有する。

- (1) AS-D-クロロアセテートエステラーゼ活性；顆粒球への分化
- (2)  $\alpha$ -ナフチルアセテートエステラーゼ活性；単球（マクロファージ）への分化
- (3) 食食能；正常白血球細胞への分化
- (4) Fcレセプター数；顆粒球・単球への分化

【0063】（方法）上記マーカーの測定は、(1)(2)は前記文献〔中谷ら、キャンサー・リサーチ (Cancer Res.), 48, 4201-4205, 1988.〕記載の方法に従った。(3)は、細胞とポリスチレンラテックスビーズを37℃で4時間インキュベートし、10個以上のビーズを取り込んだ細胞数をカウントした。細胞の viability（生細胞の割合）はトリパンブルー試薬で染色されない細胞を生細胞とし、全体の細胞数に対する百分率を食食能として算出した。(4)はモレキュラー・イムノロジー (Molecular Immunology), 25(11), 1159-67, 1988. に記載された方法に従った。

【0064】（結果）次にメナテトレノンが、上記の分化誘導マーカーに与える効果を表7に示す。

【0065】

【表7】

## その他の分化誘導マーカーに対するメナテトレノンの効果

細胞	メナテトレノ 濃度 (M)	ASD-クロロアセート エステラーゼ活性	$\alpha$ -ナフチルセチル エステラーゼ活性	食食能	F. レクター 数
HL60	コントロール	36.5 $\pm$ 5.6	12.6 $\pm$ 1.8	12.8 $\pm$ 3.1	1.6 $\pm$ 0.2
	$1 \times 10^{-6}$	37.5 $\pm$ 2.0	15.3 $\pm$ 2.2	21.4 $\pm$ 4.4	1.8 $\pm$ 0.1
	$2 \times 10^{-6}$	27.6 $\pm$ 3.4	22.7 $\pm$ 3.6	37.5 $\pm$ 13.5	1.7 $\pm$ 0.1
U937	コントロール	7.2 $\pm$ 2.2	6.2 $\pm$ 1.7	12.5 $\pm$ 2.9	1.2 $\pm$ 0.3
	$1 \times 10^{-6}$	13.2 $\pm$ 0.2	13.9 $\pm$ 4.2	17.8 $\pm$ 1.2	12.5 $\pm$ 10.7
	$2 \times 10^{-6}$	10.0 $\pm$ 4.2	33.1 $\pm$ 10.3	18.2 $\pm$ 6.7	8.8 $\pm$ 2.7
ML1	コントロール	11.3 $\pm$ 4.2	9.7 $\pm$ 2.3	8.9 $\pm$ 3.5	2.5 $\pm$ 0.9
	$2 \times 10^{-6}$	27.8 $\pm$ 2.6	14.3 $\pm$ 3.2	34.4 $\pm$ 12.9	31.4 $\pm$ 5.0
	$1 \times 10^{-5}$	38.6 $\pm$ 7.4	34.8 $\pm$ 14.4	40.0 $\pm$ 0.0	13.0 $\pm$ 0.0
K562	コントロール	6.2 $\pm$ 0.4	5.3 $\pm$ 2.5	15.2 $\pm$ 7.9	2.8 $\pm$ 2.0
	$1 \times 10^{-6}$	6.7 $\pm$ 3.8	2.6 $\pm$ 1.3	19.5 $\pm$ 3.0	3.6 $\pm$ 1.9
	$2 \times 10^{-6}$	6.9 $\pm$ 3.2	4.0 $\pm$ 0.9	10.2 $\pm$ 3.0	6.7 $\pm$ 3.2

【0066】表7から明らかなように、メナテトレノン処理により、ヒト骨髓芽球白血病細胞 HL60 およびヒト単芽球白血病細胞 U937 において、 $\alpha$ -ナフチルセチルエステラーゼ活性および食食能が正常化しており、これらのヒト白血病細胞が単球（マクロファージ）へ分化誘導されたことがわかる。またヒト骨髓芽球白血病細胞 ML1においては、すべての分化誘導マーカーが改善されており、顆粒球および単球へ分化誘導されたことがわかる。これらの結果より、メナテトレノンはタイプの異なる各種ヒト白血病培養細胞に対し、広く分化誘導能を有していることが明らかである。

【0067】

【図面の簡単な説明】

【図1】 前骨髓性白血病細胞 HL60 に対するメナテトレノン濃度と分化誘導作用との関係を示した図である。

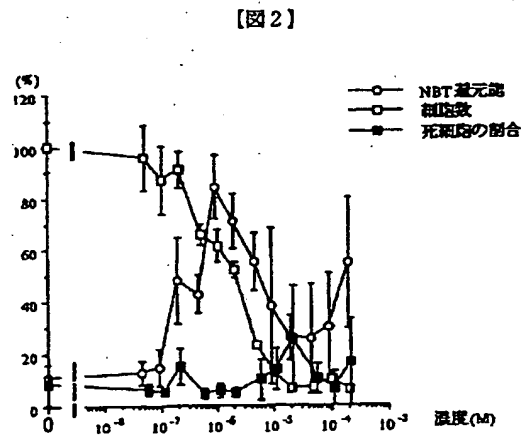
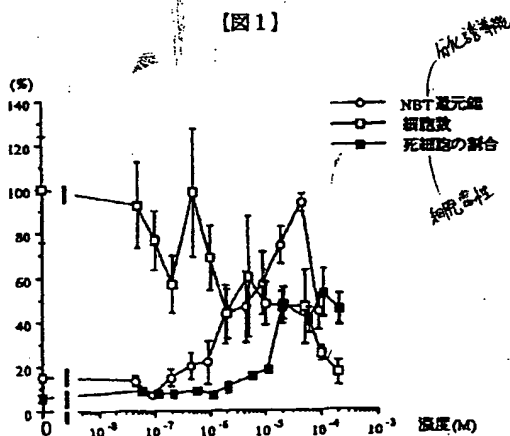
（各群とも  $n=3$ 、平均 $\pm$ 標準誤差で示す）

【図2】 ヒト単芽球 U937 細胞に対するメナテトレノン濃度と分化誘導作用との関係を示した図である。

（各群とも  $n=3$ 、平均 $\pm$ 標準誤差で示す）

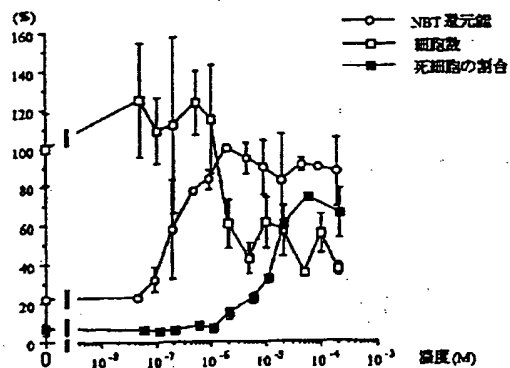
【図3】 ヒト骨髓芽球白血病細胞 ML1に対する、メナテトレノン濃度と分化誘導作用の関係を示した図である。（各群とも  $n=3$ 、平均 $\pm$ 標準誤差で示す）

【図4】 ヒト骨髓赤芽球白血病細胞 K562 に対するメナテトレノン濃度と分化誘導作用との関係を示した図である。（各群とも  $n=3$ 、平均 $\pm$ 標準誤差で示す）

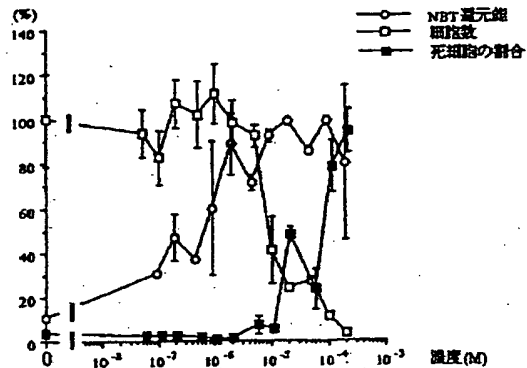




【図3】



【図4】



フロントページの続き

(72)発明者 田邊 義雄

埼玉県本庄市東台 2-3-9 メゾン小  
暮201

(72)発明者 大沢 重光

埼玉県本庄市見福 1-10-12

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☒ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☒ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**